

**Recherche sur l'activité
antimicrobienne des associations:
borate de phénylmercure-pénicilline,
borate de phénylmercure-
chloramphénicol**

THÈSE

*présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire*

par

*Pierre Jean-Charles STEINER
de Genève*

Thèse N° 353

GENÈVE
Imprimerie Nationale
1979

**Recherche sur l'activité
antimicrobienne des associations:
borate de phénylmercure-pénicilline,
borate de phénylmercure-
chloramphénicol**

THÈSE

*présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire*

par

*Pierre Jean-Charles STEINER
de Genève*

Thèse N° 353

GENÈVE
Imprimerie Nationale
1979

La Faculté de médecine, sur le préavis du Professeur Bernard MACH autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 21 juin 1979

Le Doyen:
André CRUCHAUD

Thèse N° 353



Je désire exprimer ici la reconnaissance que je dois au regretté Professeur Robert-Henri Regamey, ancien Directeur de l'Institut Universitaire de Microbiologie Médicale, dont l'enseignement, les conseils et l'amitié m'ont été précieux pour la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier, en outre, le Professeur Bernard Mach, Directeur du Département de Microbiologie, qui a accepté de présenter cette thèse à la Faculté de Médecine de l'Université de Genève.

Je remercie également le Docteur A. Abiad pour son dévouement et son aide amicale.

Je remercie enfin tous les collaborateurs de l'ancien Institut Universitaire de Microbiologie Médicale qui ont facilité mes travaux.

A MA FAMILLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545903_0018

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION	1
II.	RECHERCHE EN MILIEU SOLIDE	3
	A. Première méthode : gélose et bandelettes	3
	1. Matériel	3
	2. Technique	4
	3. Résultats	6
	4. Discussion	10
	B. Deuxième méthode : cupules	10
	1. Matériel	10
	2. Technique	11
	3. Résultats	13
	4. Discussion	18
III.	RECHERCHE EN MILIEU LIQUIDE AU BIOPHOTOMETRE	20
	1. Matériel	20
	2. Technique	21
	3. Résultats	21
	4. Discussion	29
IV.	CONCLUSIONS	31
V.	RESUME	33
VI.	BIBLIOGRAPHIE	34

I. INTRODUCTION

L'intérêt d'une association réside dans l'obtention d'un phénomène synergétique qui accroît considérablement l'efficacité d'une thérapie anti-infectieuse. Un tel phénomène ne peut être exploité dans la pratique thérapeutique sans avoir été préalablement étudié en laboratoire de façon détaillée. La recherche systématique de synergisme pourrait être d'un grand secours dans le cas de bactéries développant des résistances aux antibiotiques.

Lorsque deux agents antimicrobiens agissent simultanément sur une population microbienne, quatre situations, selon Jawetz (1952), peuvent se présenter :

- | | |
|------------------------|--|
| 1. <u>Antagonisme</u> | l'action combinée est inférieure à celle de l'agent le plus efficace employé seul. |
| 2. <u>Indifférence</u> | l'action combinée ne dépasse pas l'action de l'agent le plus efficace employé seul. |
| 3. <u>Addition</u> | l'action combinée équivaut à la somme des actions de chaque médicament employé seul. |
| 4. <u>Synergisme</u> | l'action combinée est nettement plus grande que la somme des deux effets (21). |

L'indifférence et l'addition sont les deux phénomènes les plus fréquents, tandis que l'antagonisme n'est pas souhaitable et la synergie est plus difficile à obtenir.

Il faut remarquer que les résultats d'une association de médicaments antimicrobiens varient selon les combinaisons et sont également propres à chaque variété de microorganisme (23).

Le problème de la synergie a fait l'objet de nombreux travaux : Jawetz et al. (1952-1953), Garrod et Dowling (1953), Lepper et al. (1956-1957), Chabbert (1953-1957), Dye (1955-1956), Garrod et al. (1962), Michel et al. (1963).

Dans le langage clinique, la synergie se rapporte à un effet thérapeutique obtenu par deux ou plusieurs médicaments, effet supérieur à celui que réaliserait l'un des médicaments utilisés à la dose thérapeutique maximum, par exemple :

- Pénicilline et chloramphénicol dans l'endocardite à streptocoque viridans (Ahern et Kirby, 1962),
- Streptomycine et oxytétracycline dans l'endocardite due au germe *hemophilus* (Geraci, 1962),

- Streptomycine et érythromycine dans l'endocardite à staphylocoque et streptocoque (Jones et Yow, 1953),
- Streptomycine, érythromycine et chlortétracycline dans l'endocardite à entérocoque (Waisbren, 1954) (21).

Le but du présent travail n'est pas la mise au point d'une nouvelle association synergique, mais l'étude des interactions entre le merfen et deux antibiotiques, ainsi que l'exposé de trois différentes méthodes permettant d'étudier le problème des associations.

- La première de ces méthodes est l'utilisation de bandelettes de papier imprégnées de l'agent antimicrobien et entrant en contact avec l'autre antibiotique et la souche bactérienne, en milieu solide (4, 33, 34, 39).
- La deuxième méthode se réalise en perçant une gélose ensemencée et en insérant dans les cupules obtenues le mélange des antibiotiques à tester (1, 4, 17).
- La troisième méthode consiste à mesurer au biophotomètre les variations de turbidité d'une suspension bactérienne mise en présence avec des solutions mélangées d'antibiotiques (5-8, 26, 27, 37).

Pour des raisons matérielles, nous nous sommes volontairement limité à n'utiliser qu'une souche bactérienne pratique à manipuler et trois produits antimicrobiens.

- Souche
Escherichia coli K12 (Institut universitaire de Microbiologie médicale, Genève).
- Agents antimicrobiens
 - 1) Borate de phénylmercure (Zyma, Nyon)
 - 2) Pénicilline G potassique (Institut universitaire de Microbiologie médicale, Genève)
 - 3) Chloramphénicol (Institut universitaire de Microbiologie médicale, Genève).

II. RECHERCHE EN MILIEU SOLIDE

A. Première méthode : gélose et bandelettes

Il s'agit d'une méthode classique, utilisée depuis longtemps et dont le principe est le suivant : on introduit dans une gélose ensemencée par un germe-test des bandelettes de papier filtre imprégnées chacune d'un agent antimicrobien différent. Ces bandelettes sont disposées de façon à s'entre-croiser, de sorte qu'à l'endroit de leur intersection, deux agents antimicrobiens sont présents. L'observation de cette zone du gazon bactérien nous permet de déterminer le comportement des agents antimicrobiens mis en présence.

1. Matériel

- a) Agents antimicrobiens
- Pénicilline G potassique en tampon 6
 - Chloramphénicol en tampon 6 avec une partie d'éthanol pour amorcer la mise en solution, la dilution finale étant faite en tampon 6
 - Borate de phénylmercure en tampon 6 avec une partie d'éthanol également.
- b) Souche
- Escherichia coli K12 (Institut universitaire de Microbiologie médicale, Genève).
- c) Milieux
- Milieu nutritif : Antibiotic Medium 3 (Difco)

Composants :	Bacto Beef Extract	1,5	g
	Bacto Yeast Extract	1,5	g
	Bacto Peptone	5	g
	Bacto Dextrose	1	g
	Sodium Chloride	3,5	g
	Dipotassium Phosphate	3,68	g
	Monopotassium Phosphate	1,32	g

Suspendre 17,5 g de poudre dans 1'000 ml d'eau distillée, stériliser ensuite à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

- Gélose : Antibiotic Medium 1 (Difco)

Composants :	Bacto Beef Extract	1,5	g
	Bacto Yeast Extract	3	g
	Bacto Casitone	4	g
	Bacto Peptone	6	g
	Bacto Dextrose	1	g
	Bacto Agar	1,5	g

Suspendre 30,5 g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée et dissoudre complètement la poudre. Stériliser ensuite à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

- d) Boîtes de Pétri en matière plastique (Nunc, Copenhague)
- e) Bandelettes de papier filtre
- f) Balance analytique Mettler P 1210
- g) Etuve réglée à 37°C (Memmert)
- h) Bain-marie réglé à 60°C (Köttermann)
- i) Four Pasteur (Memmert)
- j) Autoclave (Fedegari NF 1162)
- k) Souche : suspension bactérienne à 68 % $\pm$ 0,1 de transmission optique à 590 nm
- l) Spectrophotomètre Beckman DB-GT.

Le papier filtre constitue un excellent absorbant, sa qualité uniforme lui permet de fixer une quantité constante de liquide pour autant que les bandes soient de même dimension.

D'après Dye (1955-1956), n'importe quel papier filtre utilisé couramment en laboratoire de diagnostic est suffisant. Un papier buvard trop épais rendrait difficile l'adhérence à la gélose. Nous avons préparé nous-même nos bandelettes en découpant des rectangles de 0,5 sur 8 cm, que nous avons stérilisées pendant 1 h au four Pasteur à 110°C. Les bandes sont conservées de façon stérile, prêtes à l'imprégnation par l'antibiotique.

2. Technique

On prépare 250 ml de gélose (partie II/1c). On la laisse refroidir (environ 45°C) et on y ajoute 0,25 ml de la suspension bactérienne (partie II/1k). Lorsque la suspension bactérienne est bien mélangée à la gélose, on la verse dans de grandes boîtes de Pétri, 30 ml de gélose par boîte.

Des solutions de nos agents antimicrobiens sont préparées à des concentrations variant selon le germe, l'agent antimicrobien et le coefficient de diffusion de ce dernier. Des expériences préliminaires permettent de choisir la concentration optimale de chaque médicament à tester.

Tremper les bandelettes de papier buvard environ 2 min dans les solutions choisies.

Deux conditions expérimentales sont possibles :

- effectuer l'essai avec des bandelettes qui ont séché 18 h à l'étuve,
- utiliser des bandelettes égouttées, humides.

Ensuite, on applique les bandes de papier sur la gélose solidifiée en effectuant une légère pression au niveau de l'intersection des bandelettes pour améliorer leur adhérence à la gélose, on les renverse et on les met ainsi préparées à l'étuve pendant 16 h.

Interprétation des résultats

A l'intersection des bandelettes de papier filtre, véhicule de l'antibiotique, quatre figures peuvent se dessiner sur le gazon bactérien :

- 1) Indifférence
- 2) Addition
- 3) Antagonisme
- 4) Synergie

comme on peut le constater sur la Fig. 1.

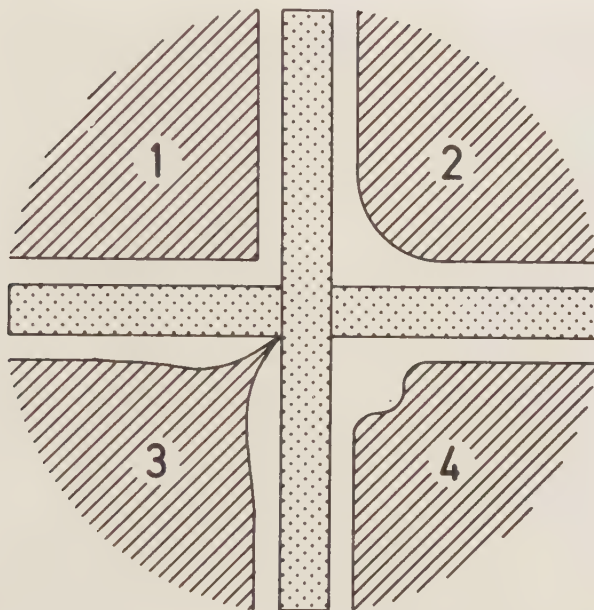


Fig. 1. - En hachuré : le gazon bactérien
 - En pointillé : les bandelettes de papier filtre
 - En blanc entre les deux : la zone d'inhibition provoquée par chaque bandelette.

3. Résultats



Fig. 2. Association pénicilline - merfen.

Les bandelettes sont imprégnées, puis appliquées humides sur la gélose enséchée. Le gazon bactérien n'a pas poussé dans l'angle où s'entrecroisent les bandelettes, mais il a dessiné une image arrondie, analogue à celle que l'on voit sur la Fig. 1, chiffre 2. Nous obtenons donc une addition.



Fig. 3. Association pénicilline - merfen.

Les bandelettes sont imprégnées, puis séchées et appliquées dans cet état sur la gélose ensemencée.

Le gazon bactérien dessine une image d'antagonisme, analogue à la zone numéro 3 de la Fig. 1.

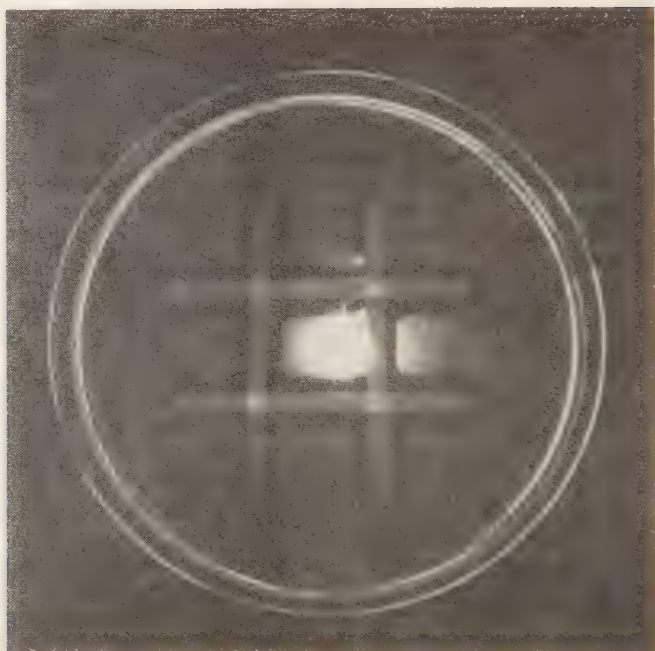


Fig. 4. Association chloramphénicol - merfen.

Les bandelettes sont dans les mêmes conditions que pour l'essai Fig. 2 (humides). Le résultat est un effet d'addition.



Fig. 5. - Merfen (bandelette verticale)
 - Pénicilline (bandelette horizontale supérieure)
 - Chloramphénicol (bandelette horizontale inférieure).

Les bandelettes sont dans les mêmes conditions que pour l'essai Fig. 3 (séchées). Le résultat est un effet d'antagonisme. La surface d'inhibition du croît bactérien due au chloramphénicol est plus vaste que les deux autres, car cet agent était plus concentré. Les zones d'action du merfen et du chloramphénicol sont bordées par un halo périphérique qu'on ne retrouve pas avec la pénicilline. Ce phénomène s'explique par les problèmes de diffusion en milieu solide de certains agents antimicrobiens.

4. Discussion

Nous noterons que, pour chaque essai que nous avons répété plusieurs fois, nous obtenons des résultats absolument constants, qui sont contradictoires puisque, pour les essais 2 et 4, nous obtenons un effet additif et, pour les essais 3 et 5, un effet antagoniste (cf. Fig. 2, 3, 4 et 5).

Le seul paramètre variant entre ces essais était l'humidité des bandelettes.

Un essai réalisé avec des bandelettes humides trempées dans une solution témoin sans agent antimicrobien n'a montré aucun effet sur le gazon bactérien; ainsi, on ne peut attribuer à l'humidité aucune action 'diluante' sur la gélose, action qui pourrait masquer ou interférer avec l'action réelle des produits antimicrobiens.

Par contre, c'est bien cette humidité qui est responsable du comportement de l'agent antimicrobien sur la gélose. En effet, le produit à tester précipite sur les bandelettes lorsque l'on sèche celles-ci. Il a ensuite de la peine à quitter son support et à diffuser dans la gélose. Les images en halo (Fig. 5) se retrouvent dans la deuxième méthode (par cupules) et soulignent les difficultés de diffusion en milieu solide du merfen et du chloramphénicol. Comme chaque produit a son propre coefficient de diffusion, les résultats varient pour chacun.

On peut contourner cette difficulté en appliquant encore humides les bandelettes préalablement imprégnées d'agent antimicrobien. En procédant ainsi, nous avons obtenu, pour nos deux associations, une addition qui sera confirmée par les deux méthodes qui suivent. L'avantage de la méthode décrite ci-dessus réside dans le fait qu'elle ne demande que des manipulations faciles et du matériel simple. Elle est pratique à utiliser comme première investigation. Ses résultats sont obtenus rapidement et sont faciles à interpréter.

B. Deuxième méthode : cupules

Cette méthode est la plus utilisée dans le titrage des antibiotiques. Les techniques de Bauer, Robert et Kirby (4) sont très répandues.

Une gélose nutritive, liquéfiée et refroidie à environ 50°C, estensemencée, puis coulée en plaques. Lorsque la gélose est solidifiée, on y pratique à l'emporte-pièce des cupules calibrées. Ces cupules reçoivent ensuite des concentrations de l'agent antimicrobien qu'on laisse prédiffuser dans la gélose à température ambiante. On place le milieu à l'étuve pendant 18 h, puis on mesure ensuite au pied à coulisse les diamètres d'inhibition obtenus (4).

1. Matériel

- a) Agents antimicrobiens et souche (partie II/A. 1a et b)
- b) Milieux (partie II/A. 1c)
- c) Boîtes de Pétri (partie II/A. 1d)
- d) Emporte-pièce comportant une plaque base métallique et des douilles qui se vissent dessus, de façon géométrique, et qui percent la gélose lorsqu'on y applique l'instrument. Le nombre des douilles peut aller de une à treize. Le diamètre de la plaque base de l'appareil est légèrement inférieur au diamètre des boîtes de Pétri.

- e) Pipette automatique de 0,1 ml (Finnpipette)
- f) Etuve (partie II/A.1g)
- g) Petite spatule ad hoc
- h) Bain-marie (partie II/A.1h)
- i) Pied à coulisse ad hoc
- j) Autoclave (partie II/A.1j)
- k) Spectrophotomètre Beckman (partie II/A.1l)

2. Technique

- 1) Préparer une assez grosse quantité de gélose et la conserver au bain-marie à 60°C.
 - 2) Au fur et à mesure des besoins, on prélève une partie de cette gélose, on y ajoute 1 ml de la suspension bactérienne (partie II/A.1k) et on la coule dans des grandes boîtes de Pétri (50 ml par boîte). Pour chacun de nos tests, nous avons coulé cinq boîtes et effectué trois mensurations par cupule, le résultat final étant donné par la moyenne de ces 15 lectures.
 - 3) On pratique dans la gélose des cupules à l'aide de l'appareil décrit ci-dessus (partie II/B.1d).
- La plaque est alors prête à l'emploi comme on le voit sur la Fig. 6.

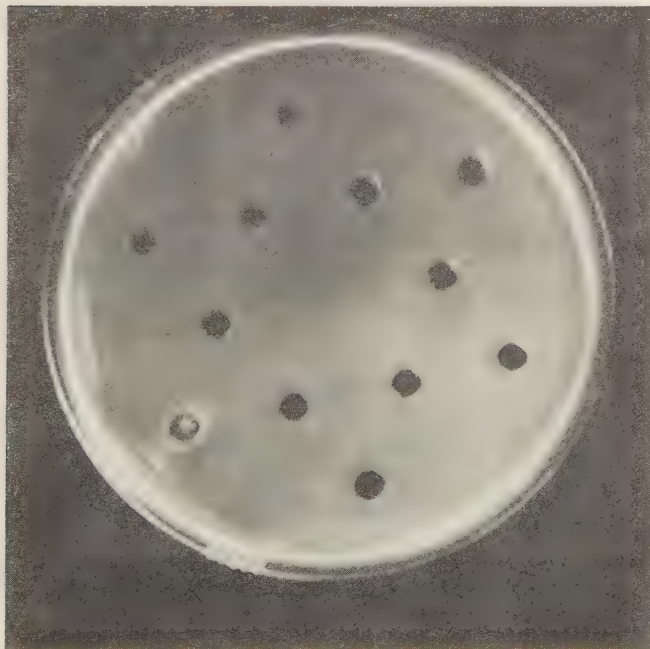


Fig. 6. Boîte de Pétri prête à l'emploi.

- 4) Préparer les solutions d'antibiotiques.
- 5) Insérer à l'aide de la pipette automatique 0,1 ml de solution (numérotée) à tester dans chaque cupule correspondante.
- 6) Fermer les boîtes et laisser prédiffuser environ 1 h à température ambiante.
- 7) Placer les boîtes à l'étuve à 37°C et laisser incuber 18 h.
- 8) Lire les résultats en mesurant les diamètres d'inhibition de croissance bactérienne que l'agent antimicrobien a provoqué en diffusant dans la gélose (Fig. 7).
- 9) Reporter les résultats sur un graphique comportant les concentrations en ordonnée et les diamètres en abscisse.

Pour mesurer ces zones d'inhibition, nous avons utilisé un pied à coulisse dont les branches de mesure étaient prolongées par des épingles collées dessus de façon à avoir deux pointeaux précis. On peut aussi utiliser un compas à pointes sèches dont on lit l'écartement sur une règle.

Les diamètres sont exprimés en mm, les concentrations en γ /cupule.

1 mg = 1000 γ .



Fig. 7. Zones d'inhibition (selon partie II/B.2;8).

Parfois la gélose est un peu dilacérée lorsqu'on retire l'emporte-pièce, mais comme on le voit dans la Fig. 7, ces fissures ne modifient pas la forme ni le diamètre de la zone d'inhibition des cupules.

3. Résultats

Merfen - pénicilline

Tableau I. Calculs des moyennes des diamètres des zones d'inhibition en fonction de la quantité d'agent antimicrobien insérée. Les solutions subissent une dilution logarithmique de 25 %

Quantité de P par cupule	Moyenne des zones d'inhibition (15 résultats)	Quantité de M par cupule	Moyenne des zones d'inhibition (15 résultats)	Moyenne des zones d'inhibition pour P et M (15 résultats)
1562,5 γ	16,36 mm	13,67 γ	15,4 mm	19,1 mm
1171,8 γ	14,77 mm	10,25 γ	14,0 mm	17,96 mm
878,9 γ	13,23 mm	7,68 γ	12,36 mm	16,6 mm
659,1 γ	12,16 mm	5,76 γ	10,6 mm	15,63 mm
494,3 γ	10,63 mm	4,32 γ	9,43 mm	14,26 mm
370,7 γ	9,16 mm	3,24 γ	8,03 mm	13,2 mm
DROITE P		DROITE M		DROITE P M

quantité d'agent antimicrobien (γ)

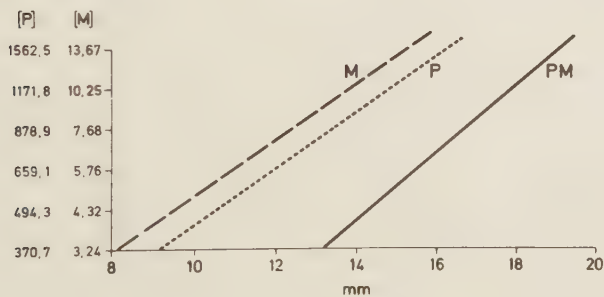


Fig. 8. Explication graphique du Tableau I :

- La droite P représente l'action de la pénicilline seule
- La droite M représente l'action du merfen seul
- La droite PM représente l'action de l'association des deux produits.

Pour simplifier l'interprétation des résultats, nous avons ajusté par une série d'essais préliminaires les concentrations de nos deux agents antimicrobiens de façon à faire coïncider l'action inhibitrice de la pénicilline et celle du merfen, de sorte que nous obtenions graphiquement des droites très voisines. Ces droites portent les indications P et M. Elles ont été construites à l'aide des résultats fournis dans le Tableau I.

La Fig. 8 montre bien que les cupules contenant le mélange ont développé un effet inhibiteur supérieur, puisque la droite PM s'est déplacée à droite; ainsi le mélange s'est montré plus efficace que l'agent le plus actif (ici la pénicilline, droite P) utilisé seul. Nous retrouvons ainsi la même conclusion que par la méthode précédente : l'addition.

Tableau II. Calcul des moyennes des diamètres des zones d'inhibition provoquées par le merfen et le chloramphénicol isolément

Graphiques	Agent antimicrobien en γ par cupule	Moyenne des 15 mesures des diamètres d'inhibition en mm
Chloramphénicol simple dose C Fig. 10	500	22,5
	375	19,6
	281,2	16,3
	210,9	14,2
	158,2	12,7
	118,6	11,5
	88,9	10,5
	66,7	9,8
Chloramphénicol double dose CC Fig. 10	1000	27,7
	750	25,8
	562,5	23,4
	421,8	20,9
	316,4	17,6
	237,3	15,1
	177,9	12,9
	133,4	11,9
Merfen simple dose M Fig. 9	17,5	20,2
	13,1	18,06
	9,8	16,1
	7,3	14,5
	5,5	12,6
	4,1	11,3
	3,1	10,1
	2,3	9
Merfen double dose MM Fig. 9	35	24,4
	26,2	21,7
	19,6	20,13
	14,7	18,8
	11	16,63
	8,3	15
	6,2	13,1
	4,6	11,76

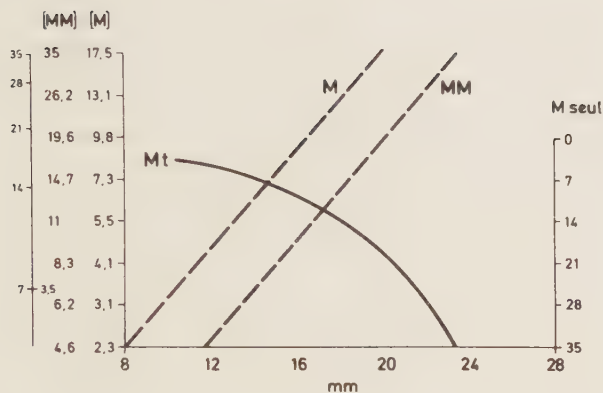


Fig. 9. Activité du merfien pour des concentrations allant respectivement de 17,5 γ/ml à 2,3 γ/ml (droite M) et de 35 γ/ml à 4,6 γ/ml (droite MM).

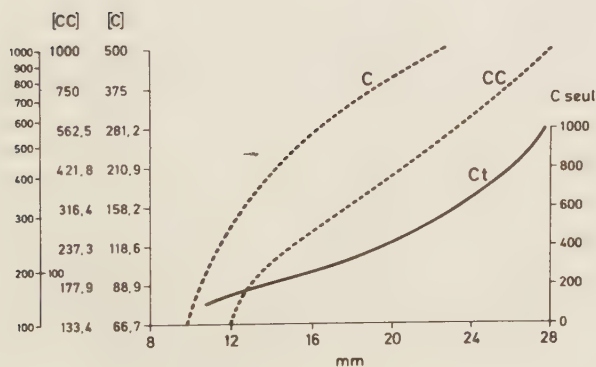


Fig. 10. Activité du chloramphénicol pour des concentrations allant respectivement de 500 γ/ml à 66,7 γ/ml (courbe C) et de 1000 γ/ml à 133,4 γ/ml (courbe CC).

Les Fig. 9 et 10 ont été réalisées grâce aux résultats fournis par le Tableau II. Sur les Fig. 9 et 10, nous avons construit les courbes théoriques Ct et Mt. Ces courbes nous seront utiles pour évaluer les résultats de l'essai croisé Fig. 11. Cet essai croisé consiste à faire varier nos concentrations proportionnellement, c'est-à-dire que, dans notre série de dilutions, pendant que le chloramphénicol décroît progressivement d'une cupule à l'autre, le merfen augmente progressivement (Tableau III).

Tableau III. Calcul des moyennes des diamètres des zones d'inhibition pour une solution contenant les deux agents antimicrobiens

C en γ par cupule	M en γ par cupule	Effet inhibiteur moyen en mm (15 résultats)
1000	0	26,5
900	3,5	26,5
800	7	26,2
700	10,5	25,2
600	14	23
500	17,5	22,3
400	21	22,7
300	24,5	23,5
200	28	23,6
100	31,5	24,8
0	35,0	24,8

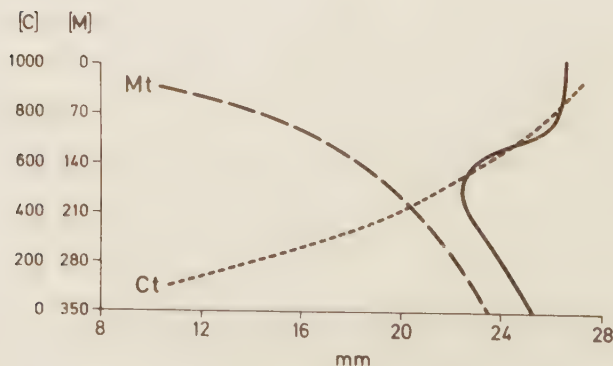


Fig. 11. En trait continu, le résultat de l'essai croisé.

Nous voyons que cette courbe obtenue par les résultats consignés dans le Tableau III a approximativement le même parcours que les courbes théoriques Mt et Ct depuis leur intersection. Ce résultat nous permet d'affirmer que le merfen n'inhibe pas l'action du chloramphénicol et vice versa; si tel était le cas, notre courbe serait déplacée vers la gauche de la Fig. 11. Un dernier essai a été réalisé en insérant dans les cupules une solution mélangée de chloramphénicol et de merfen qui s'appauvrit régulièrement de ces deux agents en même temps.

Tableau IV. Calcul des moyennes des diamètres des zones d'inhibition pour une solution contenant du chloramphénicol et du merfen

C en γ par cupule		M en γ par cupule	Effet inhibiteur moyen en mm (15 résultats)
500	+	17,5	21,8
375	+	13,1	20
281,2	+	9,8	17,43
210,9	+	7,3	14,8
158,2	+	5,5	13,1
118,6	+	4,1	11,6
88,9	+	3,1	10,8
66,7	+	2,3	9,9

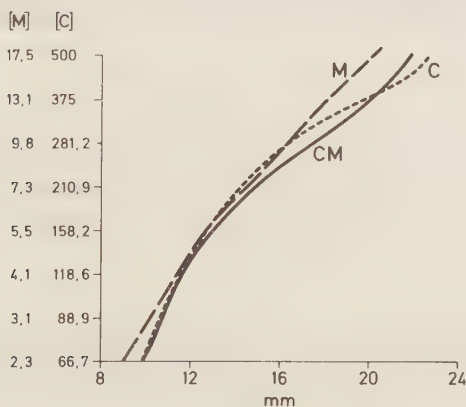


Fig. 12. Résultat de l'association du merfen et du chloramphénicol (courbe CM) par rapport à l'effet du merfen seul (courbe M) et du chloramphénicol seul (courbe C).

Bien que la courbe CM soit située à droite des deux autres, il est difficile de parler d'addition pour une marge aussi discrète. Cet essai semblerait indiquer plutôt que notre association est indifférente au lieu d'additive. Nous pensons pouvoir attribuer ce résultat aux problèmes de diffusion du merfen et du chloramphénicol en milieu solide.



Fig. 13. Diffusion imparfaite du chloramphénicol et du merfen en milieu solide.

Dans la Fig. 13, trois cupules montrent une zone d'inhibition comportant un halo périphérique. C'est l'image que l'on obtient avec le chloramphénicol et le merfen. Deux autres cupules n'ont pas de halo périphérique. Elles contiennent de la pénicilline. La zone d'inhibition est nette. Ces images nous renvoient à la Fig. 5 où le même phénomène était mis en évidence.

4. Discussion

Comme c'était déjà le cas pour la méthode des bandelettes, nous nous heurtons ici aux problèmes de diffusion de certains agents antimicrobiens en milieu solide. Si la pénicilline diffuse bien et ne pose pas de problèmes au niveau de la lecture des résultats, il n'en va pas de même pour le merfen et le chloramphénicol (13). Ces deux agents, en effet, ont plus de peine à diffuser et donnent dans les deux méthodes des images en halo qui introduisent une certaine marge d'imprécision dans les résultats. Nos essais de la deuxième partie montrent cependant par regroupement que nous avons bien affaire à une addition dans le cadre des deux associations réalisées.

Toutes conditions étant égales, la méthode donne des résultats satisfaisants et reproductibles. Elle offre une précision allant de pair avec l'expérience et l'application de l'opérateur. Les manipulations qu'elle nécessite sont plus longues et plus délicates que pour la méthode des bandelettes, mais les résultats sont plus précis et utilisables quantitativement, puisque cette méthode est largement utilisée dans le titrage des antibiotiques. La seule réserve que nous ferons s'adresse au coefficient de diffusion des agents antimicrobiens à tester. S'il s'avère que leur diffusion en milieu solide est insuffisante, nous préférons à cette méthode une technique en milieu liquide.

III. RECHERCHE EN MILIEU LIQUIDE AU BIOPHOTOMETRE

1. Matériel

- a) Agents antimicrobiens, souche et milieu (cf. partie II/A.1a,b,c)
- b) Spectrophotomètre Beckman (cf. partie II/A.1k et l)
- c) Balance analytique (cf. partie II/A.1f)
- d) Etuve réglée à 37°C (cf. partie II/A.1g)
- e) Bain-marie réglé à 60°C (cf. partie II/A.1h)
- f) Autoclave (cf. partie II/A.1j)
- g) Biophotomètre enregistreur Jouan Bio-log λ II.

Avant de réaliser l'observation biophotométrique avec l'appareil de Jouan, nous avons étalonné pour chaque essai notre bouillon à $68\% \pm 0,1$ de transmission optique (T.O.) avec le spectrophotomètre Beckman, ce qui correspond après comptage à 42.10^7 germes/ml.

Nous avons plongé ensuite le flacon dans de la glace sèche afin de bloquer le croît bactérien; cela nous permet de maintenir notre transmission optique à $68\% \pm 0,1$ jusqu'à l'utilisation de la suspension bactérienne.

Le principe du biophotomètre enregistreur employé pour nos essais est le suivant :

Une source lumineuse montée sur un chariot mobile se déplace toutes les 20 sec et traverse alternativement chacune des 6 cuves où se trouve la culture. A la sortie de la cuve, le faisceau vient frapper une des 6 cellules photoélectriques qui sont reliées à un galvanomètre à 6 courbes. Six diaphragmes permettent le réglage indépendant de l'intensité lumineuse traversant les cuves; ainsi au début de l'expérience, on peut faire coïncider les points de notre enregistrement pour les 6 cuves. Ces dernières se trouvent dans une enceinte dont la température est maintenue constante par un système de chauffage électrique à thermostat et refroidissement à air (27).

Là, une remarque s'impose. Lors de nos essais, la température ambiante était d'environ 30°C, ce qui ne permettait pas un bon refroidissement de l'enceinte par le ventilateur incorporé; aussi avons-nous été astreint d'ajouter un système de refroidissement à eau, indépendant, que l'on peut brancher sur le biophotomètre.

Chaque influx sur la cellule photoélectrique, influx conditionné par la turbidité du milieu de culture, se traduit par un point porté sur un rouleau de papier enregistreur pour chaque cuve. Le poinçon enregistreur imprime sur la bande de papier un point de couleur différente. Sur la bande de papier, la turbidité de chaque cuve sera transcrite toutes les 2 min (20 sec par cuve fois 6 cuves = 2 min). Ce système permet de suivre toutes les variations de turbidité qui surviennent dans le milieu de culture et qui expriment l'importance du croît bactérien.

L'appareil possédant 6 cuves, il est possible d'étudier un même germe soumis à 6 influences différentes. Par exemple, on obtiendra des courbes de

croissance qui démontrent le développement d'un germe placé dans des conditions normales, puis le ralentissement progressif imprimé par l'adjonction au milieu de culture de quantité croissante de désinfectants ou d'antibiotiques.

Les cuves sont en verre Pyrex cylindriques, d'une épaisseur de 30 mm, munies d'une tubulure perpendiculaire à l'axe de la cuve. Leur volume est de 10 ml. Le mélange dans les cuves est assuré par une agitation magnétique qui fonctionne pendant toute la durée de l'expérience. L'agitateur est constitué par une petite tige de fer doux entourée de Teflon, à laquelle une source magnétique sous-jacente imprime un mouvement de bascule régulier, dont l'ampleur et la fréquence sont réglables.

Le biophotomètre enregistreur présente les avantages majeurs de pouvoir étudier au cours d'une seule phase expérimentale un témoin et cinq variables, puis de suivre l'influence d'un des facteurs de variabilité dès le début de l'essai et pendant toutes les phases du développement.

2. Technique

- a) Etalonner à 68 % de transmission optique (cf. partie III/1b) un milieu nutritif incubé pendant 18 h à 37°C et le placer dans de la glace sèche.
- b) Prélever 1 ml de ce milieu nutritif et ensemencer 60 ml de bouillon stérile froid (conservé jusqu'alors dans de la glace sèche).
- c) Répartir 9 ml de bouillon dans chacune des 6 cuves à disposition.
- d) Ajouter dans chaque cuve 1 ml de la solution d'agent antimicrobien.
- e) Placer les cuves dans le biophotomètre Jouan que l'on a enclenché environ 1/2 h avant, pour que l'enceinte thermique ait atteint sa température constante de 37°C.
- f) Avant de pouvoir étudier les associations proprement dites selon ce protocole, il convient de déterminer pour chaque médicament à tester sa concentration optimum. Pour ce faire, nous effectuons une série d'essais préliminaires qui nous permettent de choisir à l'aide d'un éventail de dilutions les concentrations nécessaires à l'obtention d'un certain effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Ce dernier doit être voisin pour chaque produit, afin de faciliter l'interprétation des résultats.
Les concentrations sont exprimées en γ /ml.
Ex. : P 380 = Pénicilline, 380 γ /ml.

3. Résultats

Sur toutes les figures suivantes, nous avons :

- en ordonnée : le % de transmission optique (de 90 % au point de départ à 10 % au point d'arrivée),
- en abscisse : le temps (1 h par colonne).

A. Association pénicilline - merfen (PM)

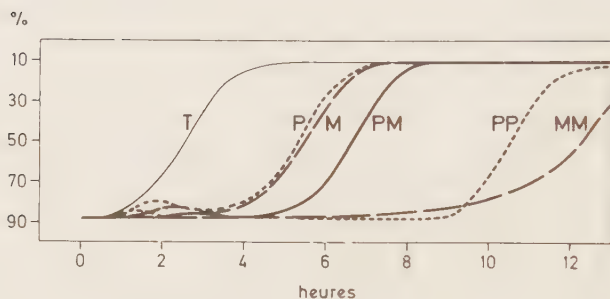


Fig. 14. Essais avec des doses simples et doubles de chacun des deux agents, puis des associations en dose simple dans une même cuve.

T	=	témoin (la cuve contient 9 ml de milieu nutritif + 1 ml d'eau distillée)
P	=	pénicilline, simple dose (380 γ /ml)
M	=	merfen, simple dose (0,7 γ /ml)
PM	=	pénicilline, simple dose + merfen, simple dose (P 380 γ + M 0,7 γ)
PP	=	pénicilline, double dose (760 γ /ml)
MM	=	merfen, double dose (1,4 γ /ml)

La Fig. 14 montre que l'effet inhibiteur de PM est plus grand que P seul ou M seul. **DONC, L'ASSOCIATION EST ADDITIVE.**

Cet essai a été répété plusieurs fois et les résultats étaient tous similaires.

Essais complémentaires

Les 2 essais suivants (Fig. 15 et 16) confirment le pouvoir additif de l'association pénicilline - merfen.

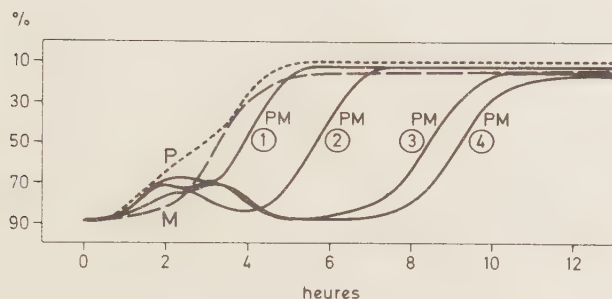


Fig. 15. Augmentation progressive des concentrations des 2 agents par rapport aux simples doses P et M.

P	=	pénicilline	380	γ /ml
M	=	merfen	0,7	γ /ml
PM1	=	pénicilline	300	γ /ml + merfen 0,49 γ /ml
PM2	=	"	380	γ /ml + " 0,49 γ /ml
PM3	=	"	300	γ /ml + " 0,7 γ /ml
PM4	=	"	380	γ /ml + " 0,7 γ /ml

La Fig. 15 montre que la pénicilline n'inhibe pas l'action du merfen et inversement, au contraire, leurs pouvoirs inhibiteurs respectifs s'additionnent.

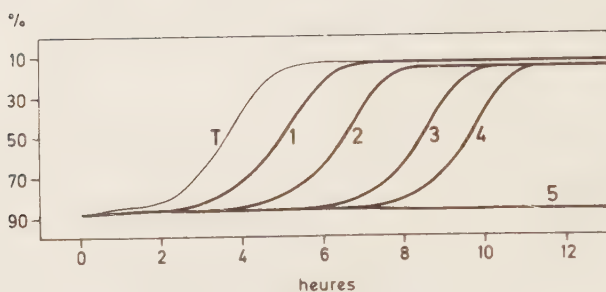


Fig. 16. Augmentation de la concentration de la pénicilline, pour une dose de merfen constante.

T	=	cuve témoin sans agent antimicrobien
1	=	merfen 0,5 γ/ml + pénicilline 100 γ/ml
2	=	" 0,5 γ/ml + " 200 γ/ml
3	=	" 0,5 γ/ml + " 300 γ/ml
4	=	" 0,5 γ/ml + " 400 γ/ml
5	=	" 0,5 γ/ml + " 500 γ/ml

Là encore, nous voyons que l'augmentation de la concentration en pénicilline accroît l'effet inhibiteur du mélange. Dans l'essai précédent (Fig. 15), nous avons remarqué de façon évidente qu'il en allait de même pour le merfen.

B. Association chloramphénicol - merfen (CM)

Les 2 figures qui suivent illustrent l'étape des essais préliminaires qui sont nécessaires pour le choix des concentrations des produits que l'on veut étudier (cf. partie III/2f).

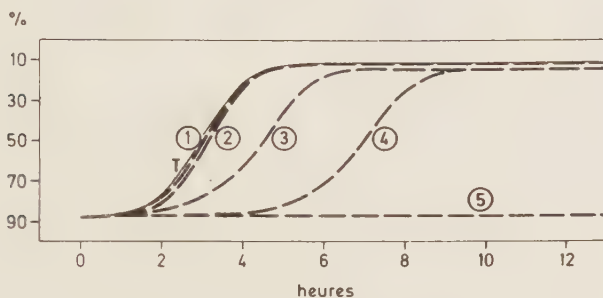


Fig. 17. Choix de la concentration de merfen à utiliser.

- T = cuve témoin sans agent antimicrobien
 1 = merfen 0,0625 γ/ml
 2 = " 0,125 γ/ml
 3 = " 0,250 γ/ml
 4 = " 0,500 γ/ml
 5 = " 1,0 γ/ml

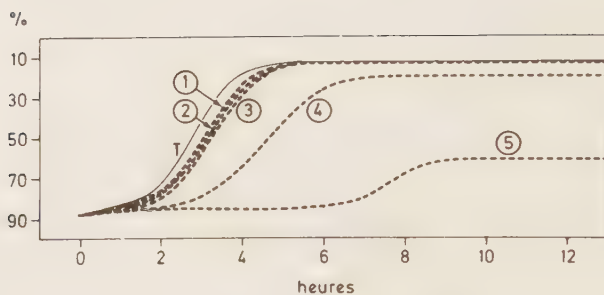


Fig. 18. Choix de la concentration de chloramphénicol à utiliser.

T	=	cuve témoin sans agent antimicrobien
1	=	chloramphénicol 3,125 γ /ml
2	=	" 6,25 γ /ml
3	=	" 12,5 γ /ml
4	=	" 25 γ /ml
5	=	" 50 γ /ml

Nous voyons ainsi, à l'aide des Fig. 17 et 18 (courbes 3 et 4), avec quelles concentrations nous pouvons travailler. Exemple de choix :

0,25 γ /ml de merfen et 25 γ /ml de chloramphénicol.

Ces 2 concentrations développent en effet une action inhibitrice analogue. Lorsque les concentrations de nos 2 produits ont été choisies, nous testons l'activité conjointe de nos 2 agents antimicrobiens, comme dans l'essai de la Fig. 19.

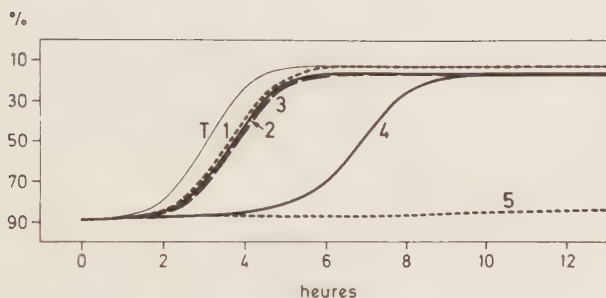


Fig. 19. Augmentation en merfen de la concentration du mélange, pour une dose de chloramphénicol constante.

T = cuve témoin sans agent antimicrobien

1 = chloramphénicol seul (12,5 γ /ml) (= courbe similaire à la courbe 3, Fig. 18)

2 = chloramphénicol (12,5 γ /ml) + merfen 0,0625 γ /ml

3 = " (12,5 γ /ml) + " 0,125 γ /ml

4 = " (12,5 γ /ml) + " 0,250 γ /ml

5 = " (12,5 γ /ml) + " 0,500 γ /ml

La cuve 1 qui ne contient que du chloramphénicol a une courbe décalée vers la gauche par rapport aux autres cuves qui contiennent aussi du merfen. Donc, l'action du merfen s'est exprimée, nous avons une addition.

L'essai de la Fig. 20 représente exactement l'opération inverse de celle de la Fig. 19.

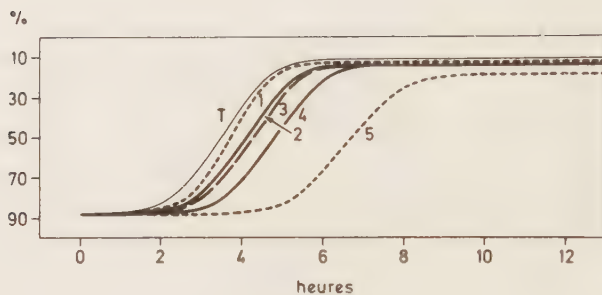


Fig. 20. Pour une concentration constante de merfen, le mélange s'enrichit en chloramphénicol.

T = cuve témoin sans agent antimicrobien

1 = merfen seul (0,125 γ /ml) (courbe similaire à la courbe 2, Fig. 17)

2 = merfen (0,125 γ /ml) + chloramphénicol 3,125 γ /ml

3 = " (0,125 γ /ml) + " 6,25 γ /ml

4 = " (0,125 γ /ml) + " 12,5 γ /ml

5 = " (0,125 γ /ml) + " 25 γ /ml

En procédant de nouveau par comparaison avec les essais 17 et 18, on voit que l'action du chloramphénicol s'ajoute à celle du merfen et que nous avons bien une addition.

Le dernier essai que nous avons réalisé confirme les résultats précédents.

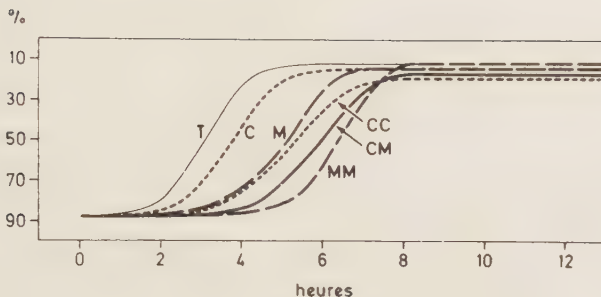


Fig. 21. Essai basé sur le même principe que celui réalisé pour l'association de la pénicilline et du merfen, Fig. 14.

- T = cuve témoin sans agent antimicrobien
 C = chloramphénicol, simple dose (12,5 γ /ml)
 M = merfen, simple dose (0,25 γ /ml)
 CC = chloramphénicol, double dose (25 γ /ml)
 CM = chloramphénicol, simple dose + merfen, simple dose
 MM = merfen, double dose (0,50 γ /ml)

Sur la Fig. 21, nous voyons de façon nette que l'association CM développe un effet inhibiteur correspondant à l'addition de la courbe C et de la courbe M. Ainsi, la cuve contenant les 2 produits développe une action qui équivaut à la somme des actions de chaque produit employé seul, et ceci correspond exactement à la définition de l'addition d'après Jawetz (1952).

4. Discussion

Nous avons réalisé, au cours de ce travail avec le biophotomètre Jouan, qu'il y avait une liste de paramètres à observer scrupuleusement si l'on voulait obtenir des résultats constants et significatifs. Nos tâtonnements initiaux nous ont permis d'éliminer certaines sources d'erreur et de dresser une liste des paramètres à respecter, notamment :

- Température** : Lorsque la température de la pièce où l'on travaille est trop élevée (plus de 25°C), le refroidissement de l'appareil par son ventilateur incorporé est insuffisant. Nous avons dû brancher un thermostat indépendant pourvu d'un système de refroidissement à eau, pour lequel le biophotomètre est prévu (27).
- Milieu de culture** : Il doit avoir la même T.O. d'une expérience à l'autre, c'est pourquoi nous avons fixé cette T.O. de manière constante à l'aide du spectrophotomètre pour chacun de nos essais (68 % $\pm$ 0,1) (11, 12, 17).

Dès que le milieu de culture est étalonné, il faut le placer dans de la glace sèche pour qu'il conserve cette concentration. Il va de soi que la dilution que l'on réalisera depuis ce milieu devra également être identique pour chaque essai.

- c) Solution d'agent antimicrobien : Nous avons remarqué que, même en conservant les solutions à l'abri de la lumière et au frigidaire, nous n'obtenions pas des résultats aussi superposables que lorsque l'on confectionnait des solutions fraîches. Ceci est d'autant plus valable si l'on utilise quelques parties de méthanol ou d'un autre volatile pour préparer les solutions mères.
- d) Cuves : Les cuves prévues pour ce photomètre sont en verre Pyrex, qui se raye facilement. Si l'on n'a pas de cuves neuves à disposition, nous suggérons de numéroter ces cuves de façon à utiliser toujours la même cuve au même emplacement dans le biophotomètre, d'un essai à l'autre.
- e) Position des cuves : L'enceinte contenant les cuves n'est pas calibrée très précisément, ce qui permet une légère variation (1,5 - 2 mm) de la distance entre la cuve et la source. Nous conseillons donc là aussi une certaine précision et recommandons de placer toujours les cuves à une distance similaire pour chaque essai.
- f) Enclencher le biophotomètre 1/2 h avant le début de l'expérience pour la stabilisation de la température de l'enceinte.

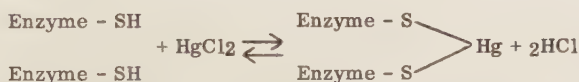
En concluant, nous dirons que lorsque la méthode est bien rodée, l'utilisation du biophotomètre Jouan est très appréciable. Elle permet d'une part de suivre automatiquement la croissance de 6 cultures microbiennes et, d'autre part, elle élimine toute subjectivité dans la lecture des résultats puisque ceux-ci sont transcrits mécaniquement sur un graphique.

Quelques causes minimales sont à la source de certaines irrégularités dans les résultats : réglage du système de chauffage, inhomogénéité dans la répartition de la température à l'intérieur de l'enceinte, différence dans l'épaisseur et la transparence du verre des cuves. Néanmoins, les courbes fournies par l'appareil sont riches en renseignements, surtout si l'on respecte les paramètres déjà mentionnés, et ces diagrammes permettent de préciser la dynamique de l'action antimicrobienne.

IV. CONCLUSIONS

Nous savons que la pénicilline agit au niveau de la paroi des bactéries et le chloramphénicol au niveau de la synthèse des protéines bactériennes (21, 29).

Les dérivés mercuriels se combinent aux groupements thiols de certains enzymes cellulaires. Ce sont des agents thioloprives qui agissent par blocage enzymatique.



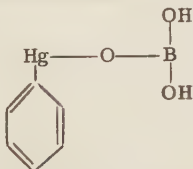
Ainsi s'explique leur activité antimicrobienne, mais aussi leur toxicité puisque ces enzymes appartiennent aussi bien aux cellules bactériennes qu'aux cellules de l'hôte.

Les dérivés minéraux du mercure sont peu utilisés : ils sont irritants et très toxiques. Pour les organomercuriels, dérivés dans lesquels l'atome de mercure est directement lié à un atome de carbone, on pense qu'il se forme l'ion organomercuriel Ar Hg^+ ou R Hg^+ . Ces produits sont utilisés dans l'antisepsie cutanée et dans la désinfection des muqueuses à des concentrations de 1 0/00 environ. Ils sont plus bactériostatiques que les dérivés minéraux tout en étant moins toxiques et moins irritants (9, 15, 19, 22).

Il existe deux types de dérivés organomercuriels selon que l'atome de mercure est ou non relié à un atome de carbone aromatique.

- a) Alcoyl mercurique (ex. : Merseptyl)
- b) Arylmercuriques (ex. : Mercurochrome, métaphène, merfen)

Le merfen a la formule suivante :



La question qui se posait était donc de découvrir si ces modes d'action très différents allaient se combiner et développer des effets synergiques, additifs, antagonistes ou indifférents. La synergie peut être envisagée si les modes d'action des substances utilisées sont très différents.

Les résultats que nous avons obtenus nous ont montré qu'il s'agissait

d'une addition, c'est-à-dire que tout se passe comme si l'on avait augmenté la posologie d'un des deux agents antimicrobiens mis en présence.

Le principal problème que nous avons rencontré au cours de ce travail est la difficulté qu'ont certains agents antimicrobiens à diffuser en milieu solide.

La première méthode (cf. partie II/A), qui est comparable à celle de l'antibiogramme, permet de tester en peu de temps un grand nombre d'associations. Si on la réserve à l'étude du comportement de substances diffusant bien en milieu solide, elle sera d'une aide précieuse dans la recherche du choix des associations (4, 17, 33).

La seconde méthode (cf. partie II/B), qui est couramment utilisée dans le titrage de solutions d'antibiotiques, demande des manipulations plus longues et plus complexes, mais elle fournit des résultats utilisables quantitativement. Comme il s'agit également d'une méthode impliquant la diffusion en milieu solide, nous lui ferons le même reproche qu'à la première méthode, bien qu'ici la difficulté puisse être contournée si on modifie certains paramètres tels que la durée et la température de prédiffusion ainsi que la façon d'ensemencer le germe test (1, 16).

La troisième méthode (cf. partie III) nécessite un appareillage beaucoup plus complexe que les deux autres, mais comme elle se réalise en milieu liquide, elle nous permet de ne pas tenir compte des problèmes de diffusion et, lorsque certains paramètres sont rigoureusement respectés, elle fournit des résultats très précis et superposables, qui de plus décrivent la dynamique du croît bactérien soumis à certaines influences (3, 5, 6, 7, 26, 27, 37).

Le laboratoire de bactériologie médicale peut apporter son aide au médecin dans le choix des associations en recherchant par une méthode appropriée celle qui sera le plus rapidement bactéricide. Lorsqu'une association est nécessaire, elle ne doit conserver que des agents antimicrobiens dont l'expérience a montré la synergie habituelle pour le type de bactérie en cause.

L'addition n'est pas un résultat suffisant pour motiver son emploi thérapeutique, d'autant plus que les résultats obtenus avec une espèce bactérienne peuvent ne pas s'appliquer à d'autres.

V. R E S U M E

Les associations : borate de phénylmercure - pénicilline et
borate de phénylmercure - chloramphénicol

ont été étudiées ici par deux méthodes en milieu solide (bandelettes et cupules) et par une méthode en milieu liquide (biophotomètre).

Les deux premières méthodes, relativement simples, ont souligné le problème de la diffusion de certains agents antimicrobiens en milieu solide.

La méthode en milieu liquide permet d'éviter cet écueil, mais elle doit respecter de nombreux paramètres et nécessite un appareillage complexe.

Le résultat des associations citées ci-dessus est une addition, ce qui signifie que les actions des agents antimicrobiens mis en présence ne sont ni antagonistes, ni indifférentes, ni synergiques, mais qu'elles s'additionnent.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABLAD, A. (1978). Evaluation de l'activité antimicrobienne des tyrothricines. Thèse des sciences pharmaceutiques No 1876, Université de Genève.
2. AFNOR (1976). Extrait du catalogue des normes françaises. Mise à jour au 1er janvier 1976.
3. ARMBRUSTER, E.H. and RIDENOUR, G.M. (1949). Soap 25, p. 103. Cité par Sykes, G.: Disinfection and sterilisation, 2nd ed., p. 370. London : E. and F.N. Spon, 1965.
4. BAUER, A.W., ROBERT, E.R. and KIRBY, W.M.M. (1960). Techniques for antibiotic sensitivity testing. Antibiot. Ann. 1959/1960, p. 574-580.
5. BERRIDGE, N.J. and BARRET, J. (1951). A rapid turbidimetric method for the assay of antibiotics. Nature, Lond. 167, 448-451.
6. BONET-MAURY, P. et PERAULT, R. (1945). Etude par enregistrement photométrique du mode d'action 'in vitro' des sulfamidés. Ann. Inst. Pasteur 71, 495-502.
7. BONET-MAURY, P. et PERAULT, R. (1946 a). Etude par enregistrement photométrique du mode d'action de la corylophylline et de la pénicilline. Ann. Inst. Pasteur 72, 135-139.
8. BONET-MAURY, P. et PERAULT, R. (1946 b). Enregistrement photométrique du mode d'action de l'association Dagenan-Pénicilline. Ann. Inst. Pasteur 72, 496-499.
9. BREWER, J.H. (1939). The antibacterial effects of the organic mercurial compounds. J. Amer. med. Ass. 112, 2009-2018.
10. CAZAC, J.L., CREMIEUX, A., DUMENIL, G. et DAURIAC, H. (1976). A propos d'une méthode d'analyse bactériologique de la flore cutanée superficielle. Méd. Mal. infect. 6, 53-57.
11. COOK, A.M. and STEEL, K.J. (1955). Bacterial suspensions in bactericide evaluation. J. Pharm. Pharmacol. 7, 224.
12. COOK, A.M. and WILLS, B.A. (1960). The use of stored suspensions of Escherichia coli in the evaluation of bactericidal action. J. appl. Bact. 21, 180-187.
13. DOCUMENTA GEIGY. Tables scientifiques, 6e éd., p. 53. Bâle : Ciba-Geigy.
14. DOWNS, C.M. (1943). The effect of bactericidal agents on Gram-negative cocci. J. Bact. 45, 137-142.
15. DULONG de ROSNAY, Ch. et FOURTILLAN, J.B. (1974). Antiseptiques et antiseptie. Documentation Sarget.
16. ELLICKER, P.R. and FRAZIER, W.C. (1938). Influence of time and temperature of incubation on heat resistance of Escherichia coli. J. Bact. 36, 83-98.
17. ERICSSON, H.M. and SHERRIS, J.C. (1971). Antibiotic sensitivity testing. Acta path. microbiol. scand., Section B, suppl. 217, p. 1-90.
18. FERGUSON, T.B. and THORNE, S.D. (1946). Brit. J. Pharmacol. 86, p. 258. Cité par Sykes, G.: Disinfection and sterilisation, 2nd ed., p. 353. London : E. and F.N. Spon, 1965.
19. FILDES, P. (1940). The mechanism of the anti-bacterial action of mercury. Brit. J. exp. Path. 21, 67-73.

20. HUNTER, A.C. (1943). The evaluation of antiseptics. J. Amer. med. Ass. 121, 25-27.
21. JAWETZ, E., MELNICK, J.L. et ADELBERG, E.A. (1973). Microbiologie médicale. Paris : Maloine.
22. JOLY, B., CHANAL, M. et CLUZEL, R. (1975). Activité bactéricide du borate de phénylmercure. Méd. Mal. infect. 5, 493-497.
23. KLARMANN, E.G. (1950). Antagonists in evaluation of antiseptics. Ann. N.Y. Acad. Sci. 53, 123-146.
24. KLARMANN, E.G. (1974). Disinfectants and antiseptics; in : Burger, A.: Medicinal chemistry, 2nd ed. London : Interscience.
25. KLIMEK, J.W. and BAILEY, J.H. (1956). Factors influencing the rate of killing Escherichia coli exposed to benzalkonium. Appl. Microbiol. 4, 53-59.
26. KRAMER, J. and KRISHBAUM, A. (1955). A turbidimetric method of assay of tyrothricin. Antibiot. Chemother. 5, 561-565.
27. LAMEIN, S., GERMAN, A. et DESVIGNES, A. (1956). De l'utilisation du biophotomètre enregistreur pour le contrôle de la pénicilline des préparations pharmaceutiques. Ann. pharm. franç. 14, 352-356.
28. McCULLOCH, E.C. (1945). Disinfection and sterilization, 2nd ed. Philadelphia : Lea and Febiger.
29. NEUMANN, M. (1975). Vade-mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux, p. 270-272. Paris : Maloine et Doin.
30. PAPATHANASSIOU, A. (1976). Désinfections germes-tests et inhibiteurs de l'activité antibactérienne. Thèse en médecine No 3528, Université de Genève.
31. PHARMACOPOEA HELVETICA (1971). 6ème édition, p. 1469-1470. Berne : Office central fédéral des imprimés.
32. PHARMACOPÉE FRANÇAISE (1965). 8ème édition, p. 1251-1253. Paris : Ordre national des pharmaciens.
33. REBER, H., FLEURY, C., GASCHEN, M., HESS, E., REGAMEY, R.H., RITTER, P., TANNER, F. et VISCHER, W. (1972). Evaluation et contrôle des désinfectants et procédés de désinfection. Société suisse de microbiologie.
34. REDDISH, G.F. (1947). Interpretation of results obtained in testing disinfectants, antiseptics and fungicides. Bull. nat. Formulary Comm. 15, 81-90.
35. REDDISH, G.F. (1949). Recent developments in methods of testing antiseptics. Amer. J. Pharm. 121, 127-158.
36. REDDISH, G.F. (1957). Antiseptics, disinfectants, fungicides, and chemical and physical sterilization, 2nd ed. London : H. Kimpton.
37. REGAMEY, R.H. et PITTON, J.S. (1964). Titration de la pénicilline et du borate de phénylmercure par biophotométrie. 10ème Symposium de l'Association Internationale de Standardisation Biologique, Paris.
38. STARK, O.K. and MONTGOMERY, M. (1935). Bacteriostatic and germicidal powers of merphenylnitrate. J. Bact. 29, 6-7.
39. SYKES, G. (1965). Disinfection and sterilization, 2nd ed., p. 43. London : E. and F.N. Spon.
40. WALLHAUSSER, K.H. und SCHMIDT, H. (1967). Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie. Stuttgart : G. Thieme.

41. WASKMAN, S.A. (1945). Microbial antagonisms and antibiotic substances, p. 167-193. New York : The Comm. Foundation.
42. WEUFFEN, W.F. (1972). In : Horn, H., Přivora, M. und Weuffen, W.F. : Handbuch der Desinfektion und Sterilisation. Band 1 : Grundlagen der Desinfektion. Berlin : Volk und Gesundheit.

